

R1

⑩ 日本国特許庁 (J P) ⑪ 特許出願公開  
⑫ 公開特許公報 (A) 昭61-69759

⑬ Int. Cl.<sup>4</sup> 識別記号 庁内整理番号 ⑭ 公開 昭和61年(1986)4月10日  
C 07 D 207/46 7242-4C  
C 08 H 1/00 6847-4J  
審査請求 有 発明の数 2 (全7頁)

⑮ 発明の名称 タンパク質の架橋反応用修飾剤及びそれを用いる方法

⑯ 特 願 昭59-193261

⑰ 出 願 昭59(1984)9月14日

⑱ 発 明 者 樋 口 勝 彦 茨城県筑波郡谷田部町東1丁目1番地 工業技術院化学技術研究所内  
⑲ 発 明 者 中 原 東 郎 茨城県筑波郡谷田部町東1丁目1番地 工業技術院化学技術研究所内  
⑳ 発 明 者 平 田 博 文 茨城県筑波郡谷田部町東1丁目1番地 工業技術院化学技術研究所内  
㉑ 発 明 者 石 川 一 彦 茨城県筑波郡谷田部町東1丁目1番地 工業技術院化学技術研究所内

㉒ 出 願 人 工業技術院長

㉓ 指定代理人 工業技術院 化学技術研究所長

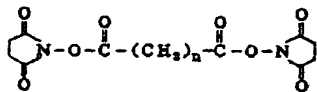
要 約

1. 発明の名称

タンパク質の架橋反応用修飾剤  
及びそれを用いる方法

2. 特許請求の範囲

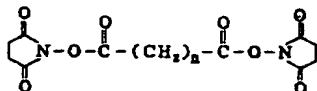
(1) 一般式



(式中、nは2~10の整数を示す)

で表わされる化合物よりなることを特徴とするタンパク質の分子間架橋反応用修飾剤。

(2) 一般式



(式中、nは2~10の整数を示す)

で表わされる化合物よりなるタンパク質の分子間架橋反応用修飾剤をタンパク質と反応させるに当り、ジメチルスルホキシドを含有するpH7~9の溶液中で反応を行わせることを特徴とする分子間架橋タンパク質の生成方法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明はバイオリファクターの触媒としての酵素の機能を向上させる目的で、タンパク質分子とタンパク質分子とを架橋反応させるための修飾剤及びそれを用いる方法に関するものである。

(従来の技術)

従来、タンパク質分子間の架橋反応修飾剤としては、ジハロゲン試薬(X-R-X)、ジイソシアネート(O=C=N-R-N=C=O)、ジチオイソシアネート(S=C=N-R-N=C=S)、グルタルアルデヒド、ジマレイミド及び異反応性架橋試薬としてN-(m-マレイミドベンゾイル)オキシスチンイミド(Kitagawa, IらJ.

Biochem, 83, 1483(1978)), ω-マレイミドアルカノイルN-ヒドロキシスクシンイミドエステル (Partis, R. D. 及 J. Protein. Chemistry, 2, 283(1983)) 等が知られている。

(発明が解決しようとする課題点)

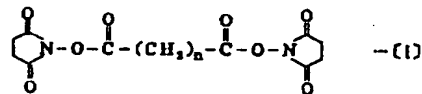
しかしながら、従来の架橋反应用修飾剤の中でグルタルアルデヒドは、常温の水溶液中で反応を進行できる利点がある一方で、架橋の炭素骨格の炭素鎖長(炭素原子数)は5であるため、短かすぎる場合があったり、あるいは架橋により大幅な酵素失活が起きる場合がある。その他の架橋性修飾剤による場合も多く、酵素で大幅な失活がみられるという欠点があった。

(課題点を解決するための手段)

本発明者らは、このような従来の架橋反应用修飾剤の欠点を克服するため鋭意研究を重ねた結果、N-ヒドロキシスクシンイミドのモノカルボン酸エステルが、脂溶性基質を触媒する酵素に対しアシル化反応による活性低下が小さいが、タンパク質の単なる分子内修飾では十分な安定化が認めら

れないのに対し、アルカン二酸ジスクシンイミドのある種のは、所定条件下でタンパク質と分子間架橋反応させると酵素の失活を起さず、かつ、安定性向上効果もすぐれることを見出し、この知見に基づき本発明をなすに至った。

すなわち本発明、一般式



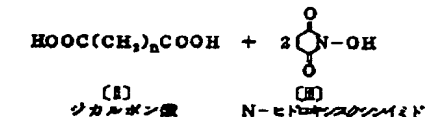
(式中、nは2~10の数値を示す)

で表わされる化合物よりなることを特徴とするタンパク質の分子間架橋反应用修飾剤及び前記一般式(I)で表わされる分子間架橋反应用修飾剤とタンパク質と反応させるに当り、ジメチルスルホキシドを含有するpH7~9の溶液中で反応を行わせることを特徴とする分子間架橋タンパク質の生成方法

を提供するものである。

前記一般式(I)で表わされる本発明の架橋反

応用修飾剤は次式(1)に従って合成することができる。



注 DCC; ジシクロヘキシルカルボジイミド  
THF; テトラヒドロフラン  
DMF; ジメチルスルホキシド

上記反応は例えば次のようにして行うことができる。

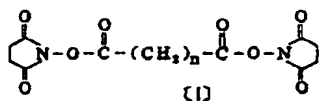
1モルの[II]と2モルの[III]をジオキサン、テトラヒドロフランあるいはジメチルスルホキシドに溶解し攪拌しながら、同一溶剤に溶かしたジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)を徐々に滴下する(約1hr)。反応は室温で行

い、反応系は水を嫌うため、用いる溶剤は完全に脱水後使用する。DCCを滴下すると[IV]の生成による白濁がみられる。滴下終了後、3hr室温に放置した後ろ別する。母液を真空乾燥し、粗生成物(白色固体)を得る。

粗生成物はヘキサン可溶部を除いた後、アルコールによる再結晶を行い、目的とする物質[I]を得る。

このようにして得られる本発明の架橋反应用修飾剤の物性値を以下に示す。

第1表



化合物番号	n	m p (°C)	T L C R f 値	M S M + 1 m / e
(1)	2	165~170	0.245	313
(2)	3	143~145	0.287	327
(3)	4	165~167	0.308	341
(4)	5	102~107	0.357	355
(5)	6	162~164	0.378	369
(6)	7	104~107	0.408	383
(7)	8	160~162.5	0.441	397
(8)	10	158~161	0.468	425

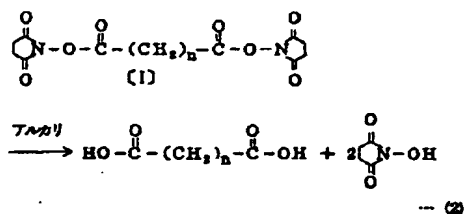
(注) T L C :

シリカゲル 0.25 mm

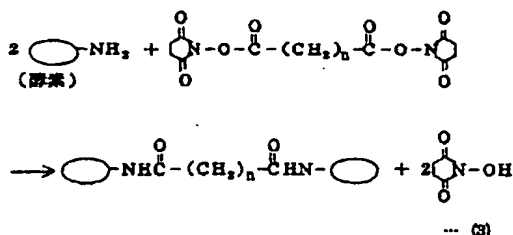
クロロホルム/エタノール/酢酸(100:5:1)

本発明の前記一般式〔1〕で表わされる修飾剤は、水に対する溶解度が低く、アルカンの炭素鎖長が大きい程、より溶けにくくなる。そこで修飾反応のために修飾剤を溶解させるための有機溶媒を必要とする。一方タンパク質の多くは、水に溶けやすく、有機溶媒には溶けにくい。これらの理由からタンパク質を溶かしやすい有機溶媒としてジメチルスルホキシドを用いる必要がある。しかしジメチルスルホキシドは高濃度では酵素を失活させる。したがって反応溶媒中のジメチルスルホキシドの濃度は酵素により異なるが80%以下に抑えるのが好ましく、より好ましくは50%程度である。反応溶媒としてはジメチルスルホキシドと共に水、ジメチルホルムアミドなどを用いることができる。

また前記一般式〔1〕で表わされる本発明の修飾剤はアルカリ中で式(2)に示すような分解を受ける。



一方、式(3)で示される修飾反応も一般にアルカリ中で、すなわちpH値の高い程、その反応速度が大きくなる。



したがって(2)の分解反応が生起しない条件下では(3)の修飾反応も起きないため比較的高いpHで反応させる必要がある。しかし高pH下では多くの酵素は不可逆的に失活するために、酵素の失活がみられない範囲で高いpHを選ぶことが必要となる。したがって修飾反応はガラス電極で測定されるpH7~9の範囲で行う。

このpHの調整は、緩衝液として行うのがよいが、具体的には、ホウ酸緩衝液、リン酸緩衝液、トリス-塩酸緩衝液、Goodの緩衝液などが用いられる。

なお、本発明の修飾反応の副反応として分子内型橋があったり、あるいは反応式(3)に示したような2量体ではなく3、4量体も生成するが、これらは分子量が大きく異なるためにゲルろ過法などにより、分取できる。

本発明の分子間架橋反応用修飾剤の使用量は、好ましくは、タンパク質のリジン残基モル濃度に対し1~10当量位の範囲である。

(発明の効果)

特開昭61- 69759 (4)

本発明によれば、タンパク質を分子間架橋させて酵素の失活を起さず、酵素分子の安定性を向上させ、また分子量が大きくなることにより、バイオリアクターの触媒としての利用性を高めるというすぐれた効果を奏する。

本発明の修飾剤及びその使用方法を適用する好ましい酵素としてはリボキシゲナーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、チロシナーゼなどがあげられる。

(実施例及び参考例)

次に実施例及び参考例により、本発明をさらに詳細に説明する。

参考例 1

修飾剤として例示化合物(2) (簡記一般式 [I] において  $n=3$ ) 51.82mg を 10 ml のジオキサンに溶解し、0.1M の各 pH の緩衝液 3 ml に、10  $\mu$ l の(2)のジオキサン溶液を入れ、攪拌下、25℃で分解産物の N-ヒドロキシスクシンイミドを 258nm の紫外吸収で追跡した。分解反応は 1 次反応であつ

上記表の結果より、pH および温度の高い程分解反応速度は大きく、分解反応を抑えるためには比較的低い温度と pH が好ましいことがわかる。

参考例 2

分解速度および修飾反応速度に対する本発明の修飾剤の炭素鎖長の影響を調べるために、pH 7.4 (リン酸緩衝液)、25℃における分解速度定数および牛血清アルブミンとの 2 次反応速度定数を求めた。修飾剤の濃度は  $10^{-4}$ M、牛血清アルブミンの濃度は 1mg/ml (リジン残基モル濃度では 897  $\mu$ M) とした。標定は 1mg/ml の牛血清アルブミン溶液 (pH 7.4 のリン酸緩衝液中)、3ml に 0.01M の各炭素鎖長 (5, 6, 8, 10 および 12) の修飾剤のジメチルスルホキシド溶液を 30  $\mu$ l 添加し、生成する N-ヒドロキシスクシンイミドを 258nm の紫外吸収により測定して行った。牛血清アルブミンと修飾剤との 2 次反応速度定数は式(4)より求めた。

た。1 次反応速度定数は第 2 表の通り ( $V_{decomp} = k_1 \cdot d \times [\text{修飾剤}]^1$ )

$^1[ ]$  は濃度を表わす。

第 2 表 修飾剤 (例示化合物(2)) の分解反応速度定数 (25℃)

pH	緩 衝 液	$k_1 \cdot d (h^{-1})$
8.9	ホウ酸緩衝液	24.0
8.4	リン酸緩衝液	7.35
7.0	"	2.37
6.5	"	1.28
6.2	"	1.25
5.5	"	0.89

また温度の分解反応速度定数への影響 (0.1M リン酸緩衝液、pH 8.4) は第 3 表の通り。

第 3 表 修飾剤 (例示化合物(2)) の分解反応速度定数 (pH 8.4)

温度 (℃)	$k_1 \cdot d (h^{-1})$
20	3.62
25	7.35
30	13.3
35	19.2
40	26.5
45	45.0

$$V = k_{1,obs} \times [\text{修飾剤}]$$

$$= (k_1 \cdot d + k_2 [\text{牛血清アルブミン}]) [\text{修飾剤}] \dots (4)$$

結果を第 4 表に示す。

第 4 表

炭素鎖長	5	6	8	10	12
$k_1 \cdot d (h^{-1})$	2.34	0.330	0.162	— <sup>1</sup>	— <sup>2</sup>
$k_2, obs (h^{-1})$	5.58	3.48	3.41	8.70	10.3
$k_2 (h^{-1})$	$3.81 \times 10^3$	$3.51 \times 10^3$	$3.62 \times 10^3$	$9.70 \times 10^3$	$11.5 \times 10^3$

分解により生ずる脂肪酸によるにごりのために正確な測定はできなかった。  
ただし 0.162 よりかなり小さい。

すなわち分解反応速度は修飾剤の炭素鎖長の増加に従って減少するが、牛血清アルブミンとの修飾反応は炭素鎖長の増加に従って増加する。

#### 実施例1 (修飾剤、例示化合物(3)の合成)

アジピン酸14.8g(0.1モル)及びN-ヒドロキシスクシンイミド23.0g(0.2モル)を1ℓの3ツロフラスコに秤取しジオキサン400mlを加えマグネチックスターで攪拌し完全に溶解した後、DCC41.2g(0.2mol)を含むジオキサン溶液200mlを加えて滴下した。滴下すると白濁が生じ、わずかに発熱するが特に冷却する必要はない。3時間放置後、沈殿をろ別する。溶剤を留去後、デシケータ中で減圧乾燥し粗生成物(白色固体)を得た。

粗生成物はHPLC分析により数種類から成る混合物であることを確認したので以下の精製を行った。

粗生成物にヘキサンを加えてよく攪拌した後静置しデカンテーションによりヘキサン可溶部を除く

(300ml×3回)した。ヘキサン不溶部は溶剤を完全に留去した後、エタノールにより再結晶を行い白色固体の例示化合物(3)、20.3gを得た。これはHPLC分析によれば95%以上の純度であった。マスマスペクトルから分子量(M+1)を確認した。

#### 実施例2 (修飾剤、例示化合物(2)ほかの合成)

アジピン酸の代りにグルタル酸13.2g(0.1モル)を用いた以外は実施例1と全く同様にして反応を行い粗生成物を得た。実施例1と同様にして可溶部を除き、減圧乾燥した後、ジオキサン50mlを加えて溶解し、エタノール150mlを加えると白色の結晶が析出する。これをろ過して例示化合物(2)の白色固体(23.6g)を得た。HPLC分析により純度は99%であった。

グルタル酸の代りにコハク酸、ヘプタン二酸、オクタン二酸、ノナン二酸、デカン二酸、又はドデカン二酸を0.1モル用い、上記と同様にし

て合成を行って、例示化合物(1)、(4)～(8)を得た。この収率、純度を第5表に示した。

第5表

化合物番号	n	収率(%)	純度(%) <sup>1</sup>
(1)	2	15%	92%
(2)	3	72%	99%
(3)	4	60%	93%
(4)	5	71%	97%
(5)	6	51%	99%
(6)	7	70%	94%
(7)	8	61%	93%
(8)	10	70%	97%

<sup>1</sup>HPLC分析による。

#### 実施例3

ジメチルスルホキシドの0.10、20～80、90%溶液を作り、それらの溶液のみかけのpHを7.0に調整した。これらの溶液4.5

mlに、リボキシゲナーゼ溶液(pH7.0のリン酸緩衝液に濃度5mg/mlで溶解したもの)を0.5mlずつ加え、25℃でインキュベートし、それらの酵素活性を測定した。測定条件は、25℃、pH9、底質のリノール酸ナトリウム100μMの底質溶液に10μlの各酵素溶液を加え、攪拌下で生成する過酸化物を234nmの紫外吸収で追跡した。その結果を第1図に示す。511間のインキュベーションでは、約50%までのジメチルスルホキシドでよくその活性を保持したが、50%以上で急激な失活を示した。

さらにリボキシゲナーゼをpHの異なる緩衝液に溶解し、25℃でインキュベートしてその活性変化をみた。その結果を第2図に示す。pH4.04～pH9.01の範囲では50時間後まで活性低下はみられなかったが、pH9.51以上でpHの高い程大きな活性低下がみられた。

#### 実施例4

0.1M-酢酸緩衝液(pH4.0)と0.1Mホウ酸緩衝液(pH8.0)をそれぞれ等量の

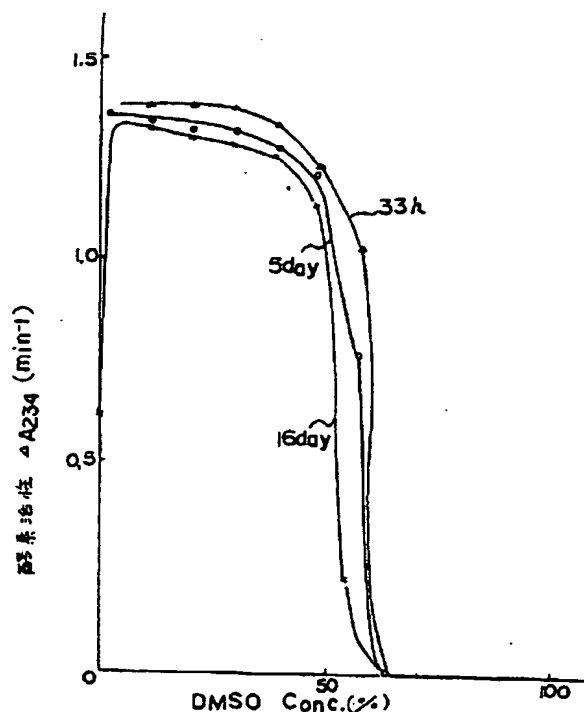
ジメチルスルホキシドと混合するとみかけのpH値はそれぞれ5.78と6.70を示した。これらのジメチルスルホキシド50%溶液にリボキシゲナーゼを5mg/mlで溶解し、0.1M修飾剤(例示化合物(2)と(7)、すなわち炭素鎖長が5のものと10のものの2種)のジメチルスルホキシド溶液を1%添加して、室温で1日攪拌した。すなわち反応条件は、リボキシゲナーゼ5mg/ml、修飾剤0.001M、ジメチルスルホキシド50%であった。その後、0.1Mリン酸緩衝液で透析を行い、ゲルクロマトグラフィー(充填剤トヨパールHW-80 Superfine)にかけた結果を第3図に示す。pH4の場合は架橋リボキシゲナーゼはみられなかったがpH6.0の場合は二量体リボキシゲナーゼがみられた。また炭素鎖の長い方が架橋反応をしやすことがわかった。

#### 4. 図面の簡単な説明

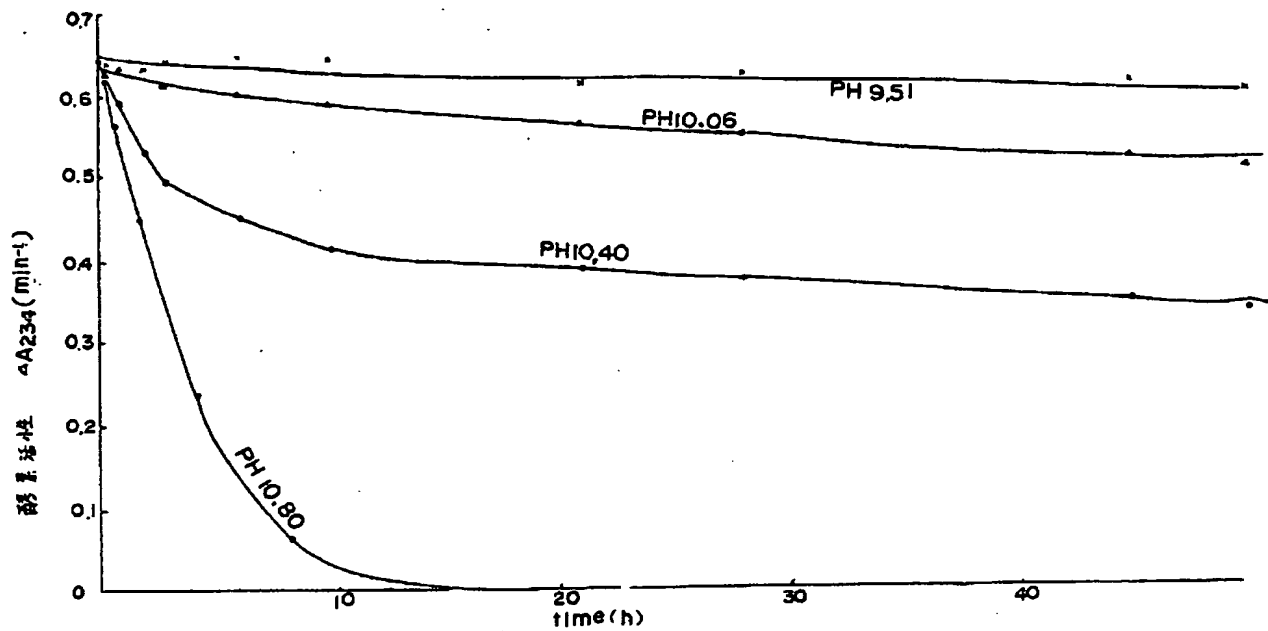
第1図は、ジメチルスルホキシド濃度と酵素活性との関係を示すグラフ、第2図はpHと酵素活性との関係を示すグラフ、第3図はゲルクロマトグラフィーによる游出遊量と游出成分との関係を示すグラフである。

出 願 人 工業技術院長 川田 裕 郎  
指定代理人 化学技術研究所長 藤 堂 尚 彦

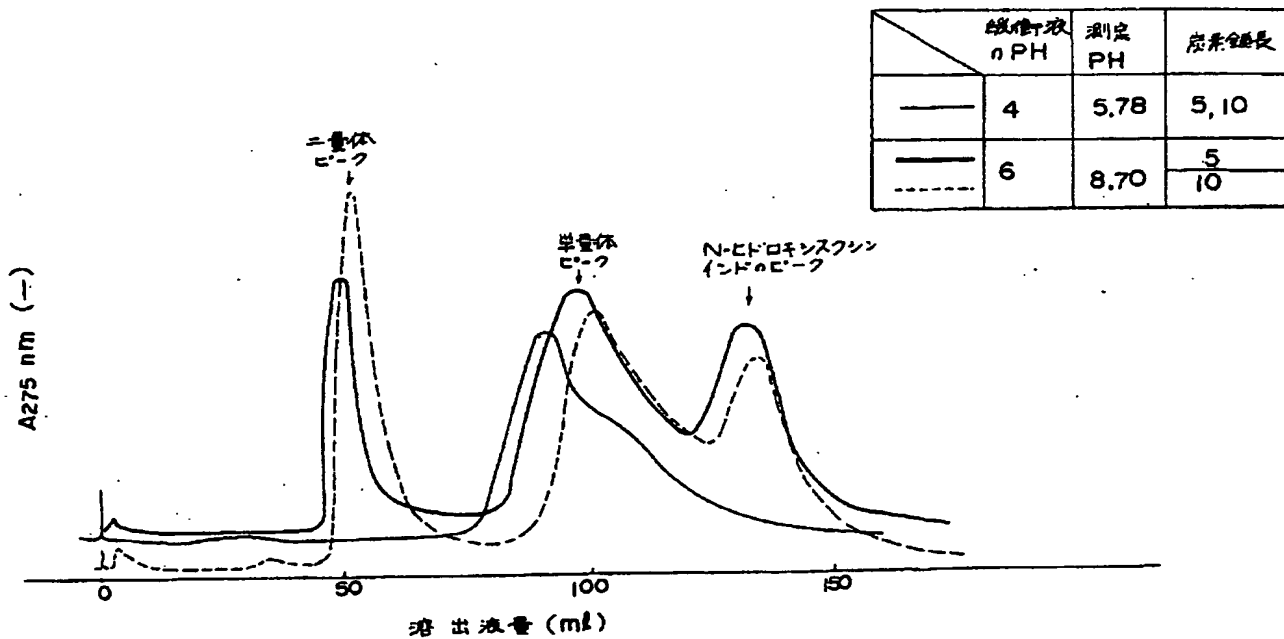
第 1 図



第 2 図



第 3 図



## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 61-069759

(43)Date of publication of application : 10.04.1986

51)Int.Cl.

C07D207/46

C08H 1/00

21)Application number : 59-193261

(71)Applicant : AGENCY OF IND SCIENCE &  
TECHNOL

22)Date of filing : 14.09.1984

(72)Inventor : HIGUCHI KATSUHIKO  
NAKAHARA HARUO  
HIRATA HIROBUMI  
ISHIKAWA KAZUHIKO

## 54) MODIFYING AGENT FOR CROSSLINKING REACTION OF PROTEIN, AND METHOD FOR USING SAME

## 57)Abstract:

**PURPOSE:** To improve the utilizability of proteins as a catalyst of bioreactor, by using a specific alkanedioic diacid bisucininimide as a modifier for the intermolecular crosslinking reaction, and reacting the imide with a protein in a weakly alkaline solution containing DMSO.

**CONSTITUTION:** The compound of formula (n is integer of 1-10) is used as a modifier for the intermolecular crosslinking of a protein. The compound is made to react with a protein (e.g. lipoxigenase, lipase, phospholipase, tyrosinase, etc.) in a solution containing DMSO and having a pH of 7-9, to obtain crosslinked protein. The amount of the modifier is preferably 1-10 equivalent based on the molar concentration of the amine residue of the protein, and the adjustment of pH is carried out preferably by a borate buffer solution, a phosphate buffer solution, etc.

**EFFECT:** The agent is inert to the deactivation of enzyme, and improves its stability.

